

## Porównanie wzrostu fibroblastów 3T3 na rusztowaniu z alginianu i kwasu poliasparaginowego. Badanie *in vitro* i *in vivo*

Tomasz Drewa<sup>1</sup>, Miłosz Jasiński<sup>1</sup>, Jolanta Polaczek<sup>2</sup>, Jan Pielichowski<sup>2</sup>, Celestyna Kierzenkowska-Mila<sup>1</sup>, Joanna Łysik-Miśkowska<sup>3,4</sup>, Agnieszka Krawczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Inżynierii Tkankowej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz, Polska

<sup>2</sup>Katedra Chemii i Technologii Polimerów, Politechnika Krakowska, Kraków, Polska

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Onkologii i Brachterapii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz, Polska

<sup>4</sup>Zakład Patologii, Centrum Onkologii, Bydgoszcz, Polska

---

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Celem pracy było zbadanie poliasparaginanu (PAA), który jest obiecującym rusztowaniem do hodowli komórek. PAA porównano z alginianem, który jest standardowo stosowany do przeszczepiania komórek i może służyć jako wzorzec.

**Materiał i metody.** Oceniono wpływ obu rusztowań na żywotność mysich fibroblastów 3T3 *in vitro*. Myszom C57B1 wstrzyknięto podskórnie alginian lub PAA zawierające komórki 3T3 oraz bez komórek. Po dwóch miesiącach pobrano wycinki z miejsc, gdzie wstrzyknięto polimery. Zbadano aktywność katepsyny D oraz poziom  $\alpha_1$ -antytrypsyny.

**Wyniki.** Żywotność komórek *in vitro* była najniższa w przypadku stosowania podłoża PAA, najwyższa zaś w grupie kontrolnej. Zaobserwowano wzrost poziomu i aktywności enzymów po wszczepieniu obu rusztowań; wzrost ten był mniejszy w przypadku rusztowań obsianych komórkami. Wzrost poziomu  $\alpha_1$ -antytrypsyny był

mniejszy w przypadku PAA w porównaniu z alginianem. Obserwowano degradację obu rusztowań w badaniu histopatologicznym.

**Wnioski.** Wszczepty zbudowane z PAA ulegają biodegradacji oraz indukują niespecyficzną odpowiedź zapalną w porównaniu z rusztowaniem z alginianu.

**Słowa kluczowe:** komórki 3T3, alginian, kwas poliasparaginianowy, inżynieria tkankowa

---

## WSTĘP

Przeżycie komórek po przeszczepieniu oraz efekt leczniczy, zależą od fizycznych właściwości wszczepu. Stosowany materiał powinien charakteryzować się odpowiednią trwałością i oporem tkankowym, odpowiednio przylegać do tkanek i nie migrować z miejsca wszczepienia. Rusztowanie do hodowli komórek powinno ulegać przebudowaniu w warunkach *in vivo*. Przeszczepiane rusztowania indukują niespecyficzną odpowiedź odpornościową, która ma wpływ na przeżycie komórek wewnątrz wszczepu [1]. Poliasparaginian (PAA) jest nowym obiecującym rusztowaniem, które może być użyte do hodowli i przeszczepiania komórek [2]. Powodem, dla którego wybrano do badań PAA jest fakt, iż niewiele jest doniesień dotyczących PAA jako rusztowania do hodowli i przeszczepiania komórek [3].

Wydaje się, iż polimer ten będzie mógł być wykorzystany w inżynierii tkankowej w przyszłości. Celem badania było zbadanie właściwości poliasparaginianu (PAA) *in vitro* i *in vivo*. PAA porównano z alginianem, który jest standardowo stosowany do przeszczepiania komórek i może służyć jako wzorzec.

## MATERIAŁ I METODY

Mysie fibroblasty 3T3 hodowano w butelkach 25 cm<sup>2</sup> (Greiner, Niemcy) w medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Niemcy), zawierającej 10% surowicy wołową płodową, w 37° C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Fibroblasty były pasażowane w momencie, gdy pokrywały 70-80% powierzchni naczynia przy użyciu roztworu 0,1% trypsyny i 0,02% EDTA (Sigma, Niemcy).

### **Doświadczenie *in vitro***

Cykliczną strukturę PAA otrzymano w wyniku cieplnej polimeryzacji kwasu asparaginowego w warunkach promieniowania mikrofalowego. Zastosowane promieniowanie mikrofalowe pozwoliło zmniejszyć czas polimeryzacji do kilku minut, a jednocześnie zwiększyło efektywność procesu i dzięki temu wyeliminowano katalizator. Polikondensacja cyklicznego PAA została przeprowadzona w temperaturze od 170<sup>0</sup>C do 230<sup>0</sup>C węglanu propylenu bez katalizatora. Kwas fosforowy został użyty jako rozpuszczalnik [4]. Szalki hodowlane pokryto PAA w następujący sposób: 0,5g PAA rozpuszczono w 5ml 100% DMSO (roztwór podgrzano i mieszano do czasu rozpuszczenia PAA, a następnie ochłodzono). Każda szalka Petri'ego została pokryta 1mm warstwą tak przygotowanym roztworem. Nadmiar PAA został usunięty a szalki pozostawiono na tydzień celem wyschnięcia. 1% alginian o niskiej gęstości zestalono przy pomocy 102mM CaCl<sub>2</sub> i pokryto nim szalki hodowlane.

Fibroblasty 3T3 zostały wysiane w gęstości 10<sup>5</sup>/25cm<sup>2</sup> na powierzchnie pokryte odpowiednio przygotowanymi biomateriałami. Żywotność komórek mierzono testem z użyciem błękitu trypanu po 24h hodowli na testowanych biomateriałach. Komórki rosnące na podłożu nie zawierającym badanych polimerów stanowiły grupę kontrolną. Żywotność komórek określono jako stosunek komórek żywych do całkowitej liczby komórek. Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi. Różnice między średnimi porównano przy pomocy testu t-Studenta. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie p<0,05.

### **Ocena wszczepów z alginianu oraz PAA zawierających komórki 3T3**

Rusztowanie PAA jak i alginianowe do przeszczepiania komórek przygotowano w sposób opisany powyżej. Do eksperymentu użyto myszy C57B1. 32 myszy doświadczalne podzielono na 4 równe grupy. Grupa kontrolna zawierała 6 myszy. W pierwszej grupie doświadczalnej wstrzyknięto 1 ml PAA, zwierzętom w drugiej grupie wstrzyknięto 2x10<sup>6</sup> komórek 3T3 zawieszonych w 1 ml PAA, w trzeciej grupie wstrzyknięto 1 ml zestalonego alginianu. Zwierzętom w czwartej grupie wstrzyknięto 2x10<sup>6</sup> komórek 3T3 zawieszonych

w 1 ml zestalonego algininu. Zwierzęta w grupie kontrolnej nie otrzymały żadnego wszczepu. Iniekcje wykonano w okolicy udowej, wytwarzając pęcherzyk o średnicy 0,5 cm między skórą a mięśniem, tak aby był łatwo wyczuwalny. Po 2 miesiącach zwierzęta uśpiono przez przedawkowanie CO<sub>2</sub>. W części obejmującej eksperyment *in vivo* przestrzegano zasad opisanych w "Principles of Laboratory animal care" wydanie NIH No. 80-23, 1978, jak również przepisów prawa narodowego.

### **Barwienie hematoksyliną i eozyną**

Wycinki pobrano z miejsc, w których uprzednio wykonano wstrzyknięcie polimerów. Wycinki zabarwiono hematoksyliną i eozyną i oceniano w mikroskopie świetlnym, wyposażonym w aparat cyfrowy (Nikon Eclipse microscope and Nikon E5400 camera, Precoptic Co, Warszawa, Polska).

### **Pomiar aktywności katepsyny D i poziomu $\alpha_1$ -antytrypsyny**

Celem oznaczenia aktywności katepsyny D, od każdego zwierzęcia pobrano 1ml krwi. Aktywność katepsyny przedstawiono porównując do aktywności 10<sup>-2</sup>nM trypsyny/mg białka/min. Poziom  $\alpha_1$ -antytrypsyny oznaczono metodą Eriksson i przedstawiono jako ilość trypsyny konieczną do zahamowania 1ml surowicy [5]. Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi. Średnie porównano przy pomocy testu t-Studenta. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie p<0,05.

## **WYNIKI**

W badaniu *in vitro*, komórki 3T3 hodowano na podłożu zbudowanym z PAA lub alginianu. Wzrost komórek porównano do komórek rosnących na podłożu z polipropylenu. Żywotność fibroblastów rosnących na podłożu z PAA była niższa niż na podłożu z alginianu, ale różnica ta nie była istotna statystycznie (ryc.1). Wszczepy były widoczne w miejscach, gdzie zostały wstrzyknięte. Wszczepy zawierające komórki wykazywały dobre właściwości mechaniczne. Podczas wycinania wszczepy zawierające mysie fibroblasty przylegały do warstwy mięśniowej. Rozmiary zbudowanych z alginianu wszczepów

wynosiły nawet około 5mm. Obserwowano różnicę w wyglądzie makroskopowym implantów zbudowanych z PAA i alginianu.

Wszczyepy z PAA miały przekrój do 2mm. Wszczyepy te ulegały dezintegracji podczas manipulacji w trakcie wycinania. Nie obserwowano w tych przypadkach integracji z warstwą mięśniówki. Właściwości wszczepów zbudowanych z alginianu były gorsze w grupie myszy, które otrzymały wszczyepy bez komórek, w porównaniu z wszczepami obsianymi *in vitro* komórkami. Wszczyepy te również ulegały dezintegracji podczas wycinania. Nie stwierdzano w tych przypadkach integracji z warstwą mięśniową. Nie obserwowano wytworzenia „neo-tkanki” ani obecności polimeru w przypadku, gdy wstrzykiwano jedynie PAA bez komórek. W tych przypadkach do badania pobrano jedynie tkankę z miejsc, gdzie wszczepiano implanty.

W badaniu histopatologicznym wycinków barwionych hematoksyliną i eozyną obserwowano wzrost komórek w obrębie wszczepów, które zbudowane były z komórek 3T3 i rusztowań z alginianu bądź PAA. Wszczyepy uległy intensywnemu przebudowaniu, w którym brały udział przeszczepione komórki (ryc. 2 i 3]. We wszczepach zawierających jedynie alginian, stwierdzano po 2-miesięcznym okresie obserwacji bezkomórkowe, szkliste masy. Nie obserwowano migracji komórek w obręb wszczepów, nie stwierdzano również degradacji ani przebudowy biomateriału w tych przypadkach.

Zaobserwowano wzrost aktywności katepsyny D i jej inhibitora u zwierząt, którym wszczepiono alginian jak i PAA. W przypadku wszczepienia rusztowań z PAA wzrost poziomu  $\alpha_1$ -antytrypsyny był niższy w porównaniu do alginianu, różnica ta nie była istotna statystycznie. Wzrost aktywności katepsyny D był wyższy w grupie myszy, którym wszczepiono PAA w porównaniu z grupą, której wszczepiono alginian ( $p=0.01$ ). Zależność ta dotyczyła również rusztowań przeszczepianych bez komórek ( $p=0.03$ ) (ryc.4 i 5). Aktywność katepsyny D i poziom  $\alpha_1$ -antytrypsyny były wyższe u zwierząt, które otrzymały wszczyepy z alginianu w porównaniu do grupy kontrolnej, choć różnice te nie były istotne statystycznie.

## DYSKUSJA

Celem pracy była ocena PAA jako rusztowania służącego do przeszczepiania komórek. Trójwymiarowe matryce ułatwiają wzrost i różnicowanie się komórek. Zjawisko to jest używane w konstruowaniu tkankopodobnych struktur. W tym celu poszukuje się

nowych biozgodnych materiałów. W pierwszym etapie badano wzrost *in vitro* mysich fibroblastów 3T3 na obu testowanych rusztowaniach. W badaniu tym użyto mysich fibroblastów 3T3, które są często stosowane w badaniach dotyczących rusztowań komórkowych do celów regeneracji [6, 7]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano niższą żywotność komórek 3T3 rosnących na rusztowaniu PAA w porównaniu z alginianem. Powody tego zjawiska pozostają niejasne. Niższa żywotność komórek na podłożu z PAA może mieć związek z toksycznymi czynnikami, które wiązały się z rusztowaniem podczas jego przygotowywania. Możliwość przygotowania rusztowania z PAA w soli fizjologicznej a nie w DMSO, być może wpłynęłaby na zwiększenie żywotności komórek. Należy nadmienić, iż 75% żywotność komórek jest akceptowalna i gwarantować powinna utrzymanie się komórek wszczepu w tkankach gospodarza.

Bardzo ważnym parametrem przy wyborze biomateriału jest reakcja na wszczepiony polimer. Częsteczki rusztowania nie powinny migrować w obrębie organizmu gospodarza, zaś komórki gospodarza powinny mieć możliwość migracji do wszczepionego materiału. Alginian jest polimerem ulegającym degradacji, który znalazł szerokie zastosowanie w przeszczepianiu chondrocytów, komórek mięśniowych, wysepek trzustkowych i wielu innych. Alginian może być stosowany jako wzorzec w badaniach nad nowymi biomateriałami [8-12]. W badaniu tym nie stwierdzono migracji komórek w obrębie rusztowania z alginianu. Nie znaleziono żadnych komórek w preparatach wybarwionych hematoksyliną i eozyną. Zjawisko braku migracji komórek w obręb rusztowania nie było opisywane w przypadku alginianu, który uważany jest za bardzo dobry biomateriał.

Mechaniczne właściwości PAA obserwowane pod koniec doświadczenia były gorsze w porównaniu z alginianem. Wydaje się, że PAA powinien zostać usieciowany tak, aby jego degradacja zachodziła wolniej, co wiązałoby się prawdopodobnie z lepszymi właściwościami mechanicznymi wszczepów przygotowanych z PAA.

Katepsyna D jest proteazą zlokalizowaną w lizosomach i bierze udział w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej.  $\alpha_1$ -antytrypsyna jest inhibitorem wielu proteaz, w tym katepsyny D.  $\alpha_1$ -antytrypsyna i katepsyna D służą do oceny odpowiedzi immunologicznej w wielu chorobach degeneracyjnych, zapalnych oraz oceny stopnia zaawansowania chorób nowotworowych. Katepsyna D nie jest charakterystycznym markerem degradacji rusztowań *in vivo*, ale w połączeniu z oceną poziomu  $\alpha_1$ -antytrypsyny daje możliwość

oceny ogólnoustrojowej reakcji organizmu na wszczepiony materiał [13-15]. Wzrost aktywności enzymu i jego inhibitora obserwowany w tym doświadczeniu, wskazywać może na zachodzące procesy przebudowania rusztowania [16]. Przeszczepione rusztowanie bezkomórkowe bądź zawierające komórki, indukuje odpowiedź immunologiczną miejscową jak i ogólnoustrojową. Częścią tej odpowiedzi jest wydzielanie proteaz przez makrofagi. Procesy te wpływają na przebudowanie rusztowania jak i na przeżycie komórek na nim przeszczepionych [9, 17]. Dlatego wydaje się, iż ze względu na ich funkcje katepsyna D i  $\alpha_1$ -antitrypsyna mogą być użyteczne jako markery, świadczące o przebudowaniu rusztowania w warunkach *in vivo*. Zaobserwowano wzrost aktywności katepsyny D u zwierząt, które otrzymały bezkomórkowy PAA jak i PAA zawierający komórki; efekt ten był słabiej wyrażony dla podłoża z alginianu. Wzrost aktywności katepsyny D świadczyć może o intensywnej przebudowie rusztowania z PAA, co może być korzystnym zjawiskiem z punktu widzenia fizjologicznych właściwości wszczepu. Fizjologiczna funkcja implantów skonstruowanych *in vitro* wiąże się z ich odpowiednią przebudową *in vivo* [7].

Wzrost poziomu  $\alpha_1$ -antytrypsyny był niższy w grupach zwierząt, którym przeszczepiano rusztowania PAA w porównaniu z alginianem.  $\alpha_1$ -antytrypsyna jest inhibitorem wielu enzymów lizosomalnych, dlatego też uzasadnionym wydaje się przypuszczenie, iż to właśnie rusztowanie z alginianu indukowało większy wzrost aktywności enzymatycznej osocza. Różnice dotyczące aktywności enzymatycznej między zwierzętami, którym przeszczepiono różne matryce nie były istotnie statystyczne, istotność statystyczną uzyskano jedynie porównując zwierzęta eksperymentalne do grup kontrolnych. Brak różnic istotnych statystycznie między grupami PAA i alginianu świadczy o pewnym ich podobieństwie, a przez to daje podstawy aby przypuszczać, iż PAA również będzie dobrym rusztowaniem do hodowli i przeszczepiania komórek. W przyszłości należałoby ocenić odpowiedź immunologiczną organizmów na zastosowane wszczepy.

Bardzo ważna obserwacja dotyczy różnic poziomów  $\alpha_1$ -antytrypsyny, jakie występowały między grupami zwierząt, które otrzymały bezkomórkowe wszczepy alginianowe oraz wszczepy alginianu zawierające komórki. Poziom  $\alpha_1$ -antytrypsyny w surowicy zwierząt, którym wszczepiono rusztowanie z komórkami był niższy w porównaniu do wszczepów bezkomórkowych. Z obserwacji tej wynikać może kilka

implikacji. Po pierwsze, wydaje się, iż przeszczepione komórki mają modulujący wpływ na przebudowę rusztowania. Po drugie, przeszczepione komórki regulują stopień odpowiedzi enzymatycznej. Wreszcie wydaje się, iż przeszczepienie komórek alogenicznych zawieszonych w obrębie rusztowania, nie ma aż tak dużego wpływu na zjawiska dotyczące odporności [8, 17, 19]. Przypuszczenia te wymagają jednak dalszych badań.

Niewiele jest doniesień dotyczących PAA jako biomateriału, stosowanego w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej [3]. Ten eksperyment miał na celu porównanie właściwości rusztowań z PAA i alginianu. Prezentowane w pracy wyniki wskazują, iż PAA jest obiecującym biomateriałem do wytwarzania rusztowań dla wzrostu i przeszczepiania komórek. Polimer wymaga modyfikacji, celem polepszenia jego właściwości mechanicznych oraz zwiększenia jego rozpuszczalności w roztworach fizjologicznych.

## WNIOSKI

1. Odpowiedź enzymatyczna była słabiej wyrażona w przypadku przeszczepienia rusztowania z komórkami, w tych przypadkach doszło też do uformowania nowej tkanki w miejscu przeszczepu. Komórki wpłynęły na prawidłową degradację biomateriałów *in vivo*.

2. Rusztowanie PAA wzbudziło mniej nasiloną odpowiedź w porównaniu z alginianem. PAA jest biomateriałem, który powinien być nadal modyfikowany.



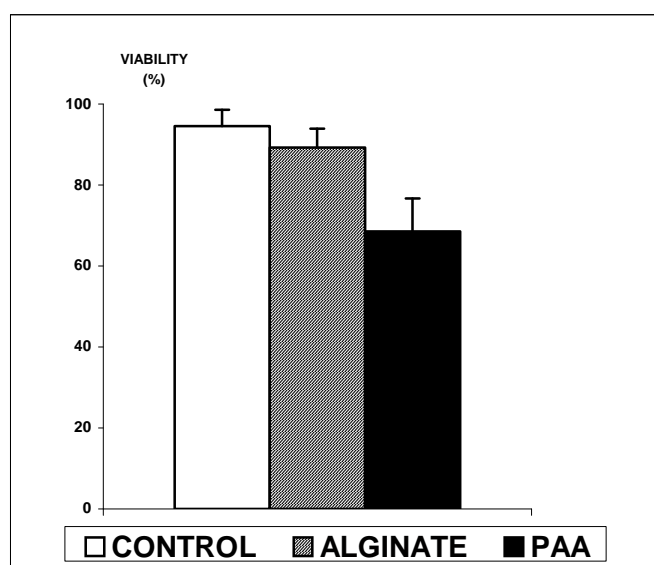
## LITERATURA

- [1] Kim B. S., Baez C. E., Atala A.: Biomaterials for tissue engineering. *World J. Urol.*, (2000), 18, 2-9.
- [2] Polaczek J., Pielichowski J., Dziński E.: Synteza poli(kwasu asparaginowego) jako materiału stosowanego w inżynierii biomedycznej. *Inżynieria Biomateriałów*, (2003), 23, 21.
- [3] Cai K., Yao K., Hou X., Wang Y., Hou Y., Yang Z., Li X., Xie H.: Improvement of the functions of osteoblasts seeded on modified poly(D,L-lactic acid) with poly(aspartic acid). *J. Biomed. Mater. Res.*, (2002), 62, 283-291.
- [4] Polaczek J., Pielichowski J., Pielichowski K., Tylek E., Dziński E.: Nowa metoda syntezy poli(kwasu asparaginowego) w warunkach promieniowania mikrofalowego. *Polimery*, (2005), 50, 11-12.
- [5] Szczeklik E.: *Enzymologia kliniczna*. PZWL Warszawa, 1974;
- [6] Drewa T., Gałązka P., Prokurat A., Wolski Z., Sir J., Wysocka K., Czajkowski R.: Abdominal wall repair using a biodegradable scaffold seeded with cells. *J. Pediatr. Surg.*, (2005), 40, 317-321.
- [7] Drewa T., Sir J., Czajkowski R., Woźniak A.: Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodeling in vivo after bladder augmentation using in vitro engineered graft. *Transplant Proc.*, (2006), 38, 133-135.
- [8] Bottino R., Fernandez L. A., Ricordi C., Lehmann R., Tsan M. F., Oliver R., Inverardi L.: Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*, (1998), 47, 316-323.
- [9] Caldamone A. A., Diamond D.: Long-term results of the endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using autologous chondrocytes. *J. Urol.*, (2001), 165, 2224-2247.
- [10] Diamond D., Caldamone A. A.: Endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using autologous chondrocytes: preliminary results. *J. Urol.*, (1999), 162, 1185-1188.
- [11] Puelacher W.C., Mooney D., Langer R., Upton J., Vacanti J. P., Vacanti C.A.: Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and

- chondrocytes. *Biomaterials*, (1994),10, 774-778.
- [12] Risbud M., Ringe J., Bhonde R., Sitterling M.: In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant*, (2001), 10, 755-763.
- [13] Wittlin S., Rösel J., Hofmann F., Stover D. R.: Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation. *Eur. J. Biochem.*, (1999), 265, 384-393.
- [14] Conus S., Perozzo R., Reinheckel T., Peters C., Scapozza L., Yousefi S., Simon H.U.: Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J. Exp. Med.* 2008 Feb 25 [Epub ahead of print].
- [15] Hausmann M., Obermeier F., Schreiter K., Spottl T., Falk W., Schölmerich J., Herfarth H., Saftig P., Rogler G.: Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, (2004), 136, 157-167.
- [16] Vashishta A., Saraswat Ohri S., Vetvickova J., Fusek M., Ulrichova J., Vetvicka V.: Procathepsin D secreted by HaCaT keratinocyte cells - A novel regulator of keratinocyte growth. *Eur. J. Cell Biol.*, (2007), 86, 303-313.
- [17] de Vos P., Smedema I., van Goor H., Moes H., van Zanten J., Netters S., de Leij L. F., de Haan A. de Haan B. J.: Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia*, (2003), 46, 666-673.
- [18] Lavezzi A., Mantovani M., Della Berta L. G., Matturri L.: Cell kinetics of human nasal septal chondrocytes in vitro: importance for cartilage grafting in otolaryngology. *J. Otolaryngol.*, (2002), 31, 366-370.

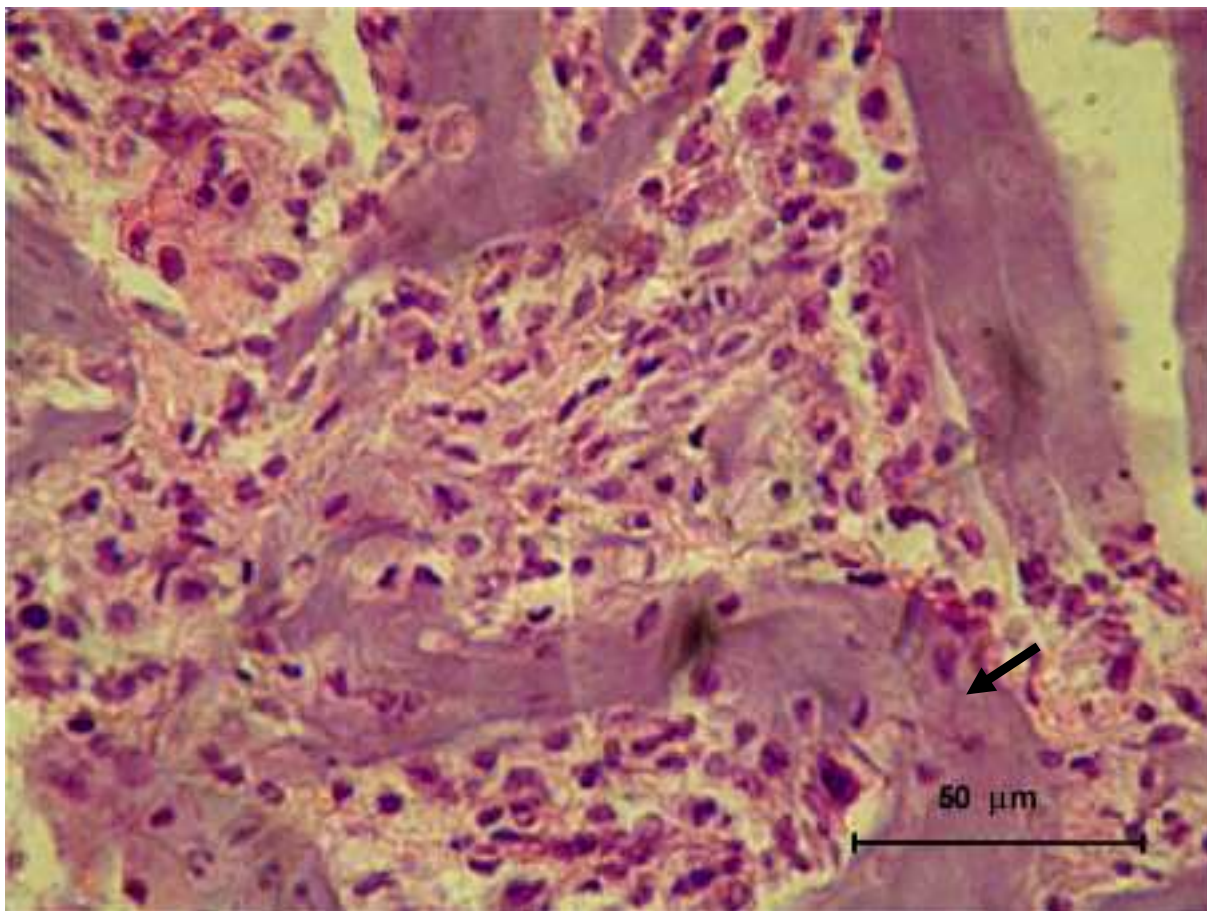
Adres autorów

Zakład Inżynierii Tkankowej  
Katedra Biologii Medycznej  
Collegium Medicum  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Kałowicza 24, 85-090 Bydgoszcz  
Tel: +48-52-585-3737; Fax: +48-52-585-3742  
E-mail: [tomaszdrewa@wp.pl](mailto:tomaszdrewa@wp.pl)



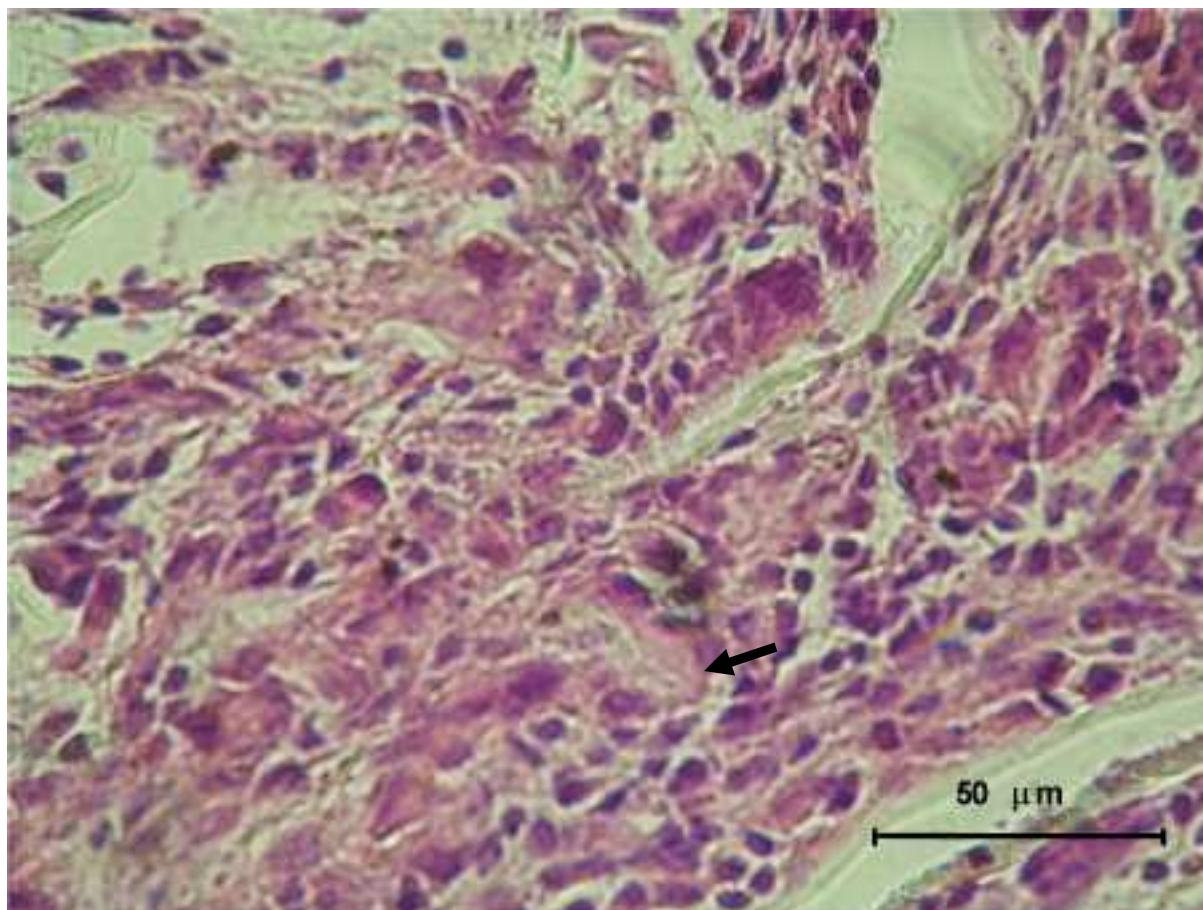
Ryc. 1. Żywotność komórek 3T3 na podłożu z alginianu i PAA w porównaniu do kontroli (polipropylen) ( $p < 0,05$ , różnica między kontrolą i PAA)

Fig. 1. 3T3 cells viability on alginate and PAA scaffolds in comparison to control (polypropylene) ( $p < 0.05$ , between control and PAA)



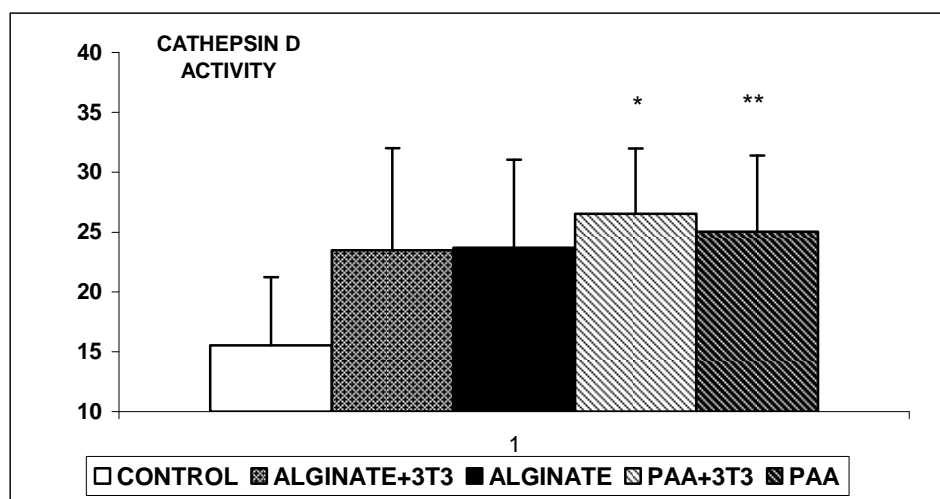
Ryc. 2. Komórki 3T3 rosnące na rusztowaniu z alginianu 2 miesiące po przeszczepieniu. Alginian zaznaczono strzałką (barwienie hematoksyliną i eozyną, pow. 600x)

Fig. 2. 3T3 cells on alginate scaffold 2 months after transplantation. Alginate indicated with arrow (hematoxylin and eosin staining, mag. 600x)



Ryc. 3. Komórki 3T3 rosnące na rusztowaniu z PAA 2 miesiące po przeszczepieniu. Struktury włókniste zaznaczono strzałką (barwienie hematoksyliną i eozyną, pow. 600x)

Fig. 3. 3T3 cells on PAA scaffold 2 months after transplantation. PAA fibrous structures indicated with arrow (hematoxylin and eosin staining, mag. 600x)

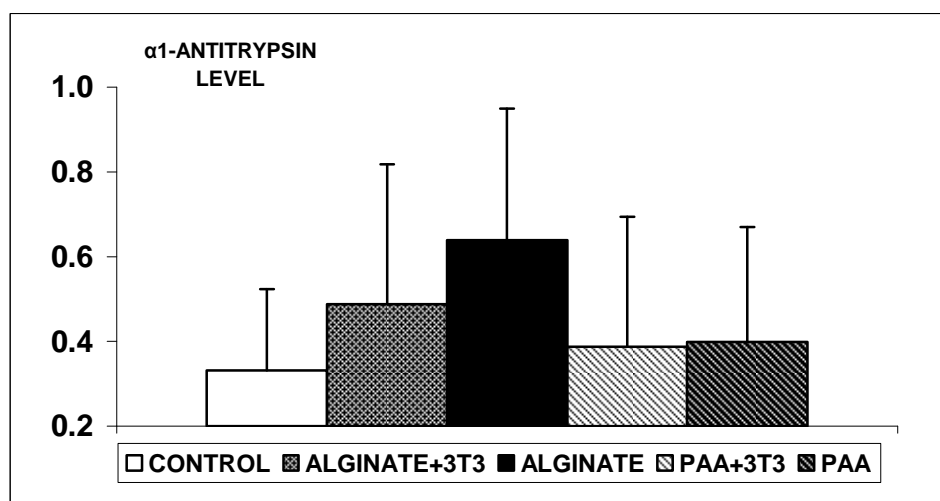


\* -  $p=0,01$  porównanie do grupy kontrolnej, \*\* -  $p=0,03$  porównanie do grupy kontrolnej

\* -  $p=0.01$  compared to control group, \*\* -  $p=0.03$  compared to control group

Ryc. 4. Aktywność Katepsyny D u myszy C57BL po 2 miesiącach od wszczepienia implantów

Fig. 4. Cathepsin D activity in C57BL mice 2 months after receiving implants



Ryc. 5. Poziom  $\alpha_1$ -antitrypsyny u myszy C57BL po 2 miesiącach od wszczepienia implantów

Fig. 5.  $\alpha_1$ -antitrypsin level in C57BL mice 2 months after receiving implants